

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS.
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平6-505636

第1部門第1区分

(43)公表日 平成6年(1994)6月30日

(51)Int.Cl.* C 12 Q 1/02 C 12 N 5/06 5/08 G 01 N 33/15	識別記号 6807-4B	府内整理番号 7906-2J 8412-4B	F I C 12 N 5/00	E
			審査請求 未請求	予備審査請求 有 (全 9 頁)

(21)出願番号	特願平4-508222
(86) (22)出願日	平成4年(1992)2月28日
(85)翻訳文提出日	平成5年(1993)8月27日
(86)国際出願番号	PCT/US92/01571
(87)国際公開番号	WO92/15700
(87)国際公開日	平成4年(1992)9月17日
(31)優先権主張番号	662,239
(32)優先日	1991年2月28日
(33)優先権主張国	米国(US)
(81)指定国	E P (A T, B E, C H, D E, D K, E S, F R, G B, G R, I T, L U, M C, N L, S E), C A, J P, K R

(71)出願人	アンティキャンサー インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92110 サン デイエゴ メトロ ストリート 5325
(72)発明者	リ リングナ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92037 ラ ジョラ ミュアランド ヴィスタ ウェイ 701
(74)代理人	弁理士 中村 稔 (外6名)

(54)【発明の名称】 皮膚の未変性状態組織培養法

(57)【要約】

皮膚の未変性状態組織培養法及び組成物が開示される。皮膚試料を、内側面を細胞外支持マトリックスに隣接させ、外側面を培地表面より上に露出させることにより、培地に浸漬したマトリックス上に該皮膚試料を置き、培地中の皮膚を皮膚培養条件下で維持する。コラーゲン含有ゲル及びホモ多糖類スポンジを含む細胞外支持マトリックス又は上層のコラーゲン含有ゲルと下層のホモ多糖類スポンジの組み合わせ基質も開示される。本発明の組織培養系を使用する皮膚毒性、毛髪成長、抗老化及び抗しわアッセイも開示される。

請求の範囲：

1. 内側面及び外側面を有する皮膚試料の未変性状態組織培養法であって、内側面を細胞外支持マトリックスに隣接させ、外側面を培地表面より上に露出させることにより、培地に浸漬したマトリックス上に該皮膚試料を置き、マトリックスとその上の皮膚を皮膚培養条件下で維持することを含む方法。
2. 細胞外支持マトリックスがコラーゲン含有ゲルを含む請求項1記載の方法。
3. コラーゲン含有ゲルがゲル化ブタ皮膚である請求項2記載の方法。
4. 細胞外支持マトリックスがホモ多糖類スponジである請求項1記載の方法。
5. ホモ多糖類がセルロースである請求項4記載の方法。
6. 細胞外支持マトリックスが上層のコラーゲン含有ゲルと下層のホモ多糖類スponジを含む請求項1記載の方法。
7. ホモ多糖類がセルロースであり、コラーゲン含有ゲルがゲル化ブタ皮膚である請求項6記載の方法。
8. 皮膚試料がヒト由来である請求項1記載の方法。
9. 未変性状態組織培養する皮膚のための細胞外支持マトリックスであって、上層のコラーゲン含有ゲルと下層のホモ多糖類スponジを含むマトリックス。
10. コラーゲン含有ゲルがゲル化ブタ皮膚であり、ホモ多糖類がセルロースである請求項9記載のマトリックス。
11. 皮膚毒性アッセイであって、
 - a) 皮膚組織培養条件下、内側面及び外側面を有する皮膚試料を、内側面を細胞外支持マトリックスに隣接させ、外側面を培地表面より上に露出させることにより、培地に浸漬した細胞外支持マトリックス上で培養し、；
 - b) 皮膚試料を推定上の毒素と接触させ；
 - c) 毒素の存在下で皮膚試料とマトリックスを所定時間維持し；
 - d) 皮膚試料の生存度により毒素の皮膚毒性を評価する；
 工程を含むアッセイ。
12. 細胞外支持マトリックスがコラーゲン含有ゲルを含む請求項11記載のアッセイ。
13. コラーゲン含有ゲルがゲル化ブタ皮膚である請求項12記載のアッセイ。

14. 細胞外支持マトリックスが多糖類スponジである請求項11記載のアッセイ。
15. ホモ多糖類がセルロースである請求項14記載のアッセイ。
16. 細胞外支持マトリックスが上層のコラーゲン含有ゲルと下層のホモ多糖類スponジを含む請求項11記載のアッセイ。
17. コラーゲン含有ゲルがゲル化ブタ皮膚であり、ホモ多糖類がセルロースである請求項16記載のアッセイ。
18. 皮膚試料が無胸腺ヌード哺乳動物由来である請求項11記載のアッセイ。
19. 生存度評価が生存細胞に特異な指示薬の皮膚試料の細胞への取込みを測定する請求項11記載のアッセイ。
20. 指示薬が放射能標識チミジンである請求項19記載のアッセイ。
21. 指示薬が光学的検出が可能な染料である請求項19記載のアッセイ。
22. 指示薬が蛍光染料である請求項19記載のアッセイ。
23. 蛍光染料がBCECF-AM、カルセイン-AM、CFDA、アクリジンオレンジ、カルセインブルー、フラ-2AM、フルオレセインジアセテート又はカルボキシ類緑体である請求項22記載のアッセイ。
24. 皮膚試料を推定上の毒素と接触させる前に皮膚試料の生存度を評価し、推定上の毒素と接触前後の評価生存度により毒素の毒性を比較する工程を更に含む請求項11記載のアッセイ。
25. 生存度評価が生存細胞に特異な第1染料及び死細胞に特異な第2染料を培地に加え、染料含有培地を所定時間維持し、場合によっては、皮膚試料を走査して皮膚試料における第1及び第2染料の分布を定量することにより行われる請求項24記載のアッセイ。
26. 第1及び第2染料が異なる放射スペクトルを有する蛍光染料である請求項25記載のアッセイ。
27. 第1蛍光染料がBCECF-AM、カルセイン-AM、CFDA、アクリジンオレンジ、カルセインブルー、フラ-2AM、フルオレセインジアセテート又はカルボキシ類緑体である請求項26記載のアッセイ。
28. 第2蛍光染料がヨウ化プロピジウム、臭化エチジウム又はエチジウムホモ

二量体である請求項26記載のアッセイ。

29. 毛髪成長アッセイであって、内側面を細胞外支持マトリックスに隣接させ、外側面を培地表面より上に露出させることにより、培地に浸漬したマトリックス上に該皮膚試料を置き、マトリックスとその上の皮膚を皮膚培養条件下で維持し、皮膚における毛髪の成長を評価することを含むアッセイ。
30. 毛髪成長アッセイであって、
 - a) 内側面及び外側面を有する毛細胞を含む皮膚試料を、内側面を細胞外支持マトリックスに隣接させ、外側面を培地表面より上に露出させることにより、培地に浸漬した細胞外支持マトリックス上で培養し、；
 - b) 毛髪成長状態の第1測定を行い；
 - c) 培地中で皮膚試料とマトリックスを所定時間維持し；
 - d) 毛髪成長状態の第2測定を行い；
 - e) 毛髪成長状態の第1及び第2測定を比較することにより毛髪成長を求める；
 工程を含むアッセイ。
31. 毛髪成長状態が毛の物理的寸法である請求項30記載のアッセイ。
32. 物理的寸法が毛の長さである請求項30記載のアッセイ。
33. 細胞外支持マトリックスがコラーゲン含有ゲルを含む請求項31記載のアッセイ。
34. コラーゲン含有ゲルがゲル化ブタ皮膚である請求項33記載のアッセイ。
35. 細胞外支持マトリックスがホモ多糖類スponジである請求項30記載のアッセイ。
36. ホモ多糖類がセルロースである請求項35記載のアッセイ。
37. 細胞外支持マトリックスが上層のコラーゲン含有ゲルと下層のホモ多糖類スponジを含む請求項30記載のアッセイ。
38. コラーゲン含有ゲルがゲル化ブタ皮膚であり、ホモ多糖類がセルロースである請求項37記載のアッセイ。
39. 皮膚試料がヒト由来である請求項30記載のアッセイ。
40. 培養前に皮膚の毛を剃る工程を更に含む請求項30記載のアッセイ。

明細書

皮膚の未変性状態組織培養法

説明

発明の技術分野

本発明は、皮膚の未変性状態組織培養法及びその方法を用いるアッセイに関する。

発明の背景

皮膚と接触する市販の製品（即ち、化粧品、家庭製品及び医薬品）は全て、その製品がヒトに対して毒がないことを確かめるために多くの試験を行わなければならない。そのような製品の毒性を評価する現在用いる手段は、費用や時間の掛かるものであり、たいていは非常に多くの生きた動物を毒性物質に曝すことを伴うものである。そのような毒性試験に生きた動物を使用することについて、社会、科学団体及び行政による批判や検査を受けることが増えてきた。生きた動物を毒性物質に曝すことのない皮膚毒性アッセイを緊急に開発することが要望されている。

皮膚毒性の生体外アッセイを開発する多くの試みが最近報告されているが、かかる系は物質の毒性作用を自然な皮膚について正確に且つ信頼できるよう予測するには不十分であることがわかった。これらの生体外アッセイの多くは、被検動物の皮膚から単離された個々の細胞を培養することを含んでいる。例えば、Van Brunt, J., Biotechnology, 9:136-137 (1991) 及び Naughton 等, Alternative Methods In Toxicology, ed. A.M. Goldberg, 7:183-189 (1989) 参照。細胞培養に基づくそのようなアッセイは、特に推定上の毒物が細胞間相互作用を変えて作用する場合、余りに簡易化されており、不十分である。

Naughton 等のモデルは、皮膚組織から皮膚線維芽細胞を単離し、その単離した線維芽細胞を適切な培地で増殖し、その線維芽細胞をナイロンメッシュに塗布し、別の皮膚試料からメラニン細胞を単離し、その単離したメラニン細胞を培養し、その培養メラニン細胞を皮膚線維芽細胞を覆いナイロンメッシュに塗布し、ケラチ

ン細胞を単離し、その単離したケラチン細胞をメラニン-線維芽細胞-ナイロンマッシュに塗布することを含んでいる。そのような系は自然な皮膚に対する相容性に欠けるばかりでなく、その技法の使用は少なくとも3種類の異なる細胞を単離し、各種類の細胞を培養し、次にナイロンマッシュ上で個々の種類の細胞と一緒に共生培養するという手間の掛かる工程を含む。著者等によれば、この系の確定に要する最短時間は約8~約14日である。

同様の方法において、現在用いられるあるいは開発中の他の生体外系は、無傷な皮膚よりむしろ別個に培養した細胞を使用している。ある場合には、異なる生物体からの細胞を単一の皮膚等価物に混合している。上記 Van Brunt。

無傷な皮膚に対する培養系を確立するために1つの実験が試みられたが、皮膚の生存力が24時間以上維持しなかった。Kao等, Toxicology and Applied Pharmacology, 81:502-516 (1985)。

学会や産業科学業界が時間とエネルギーを費やしたにもかかわらず、長時間未変性状態の三次元構造を維持しながら培養した皮膚の生存が保たれ増殖することができる皮膚組織培養系は現在有効なものがない。

本発明は、皮膚に対する長期間未変性状態組織培養系を提供するものであり、そのような系の緊急で切実な要望を解決するものである。

発明の要約

本発明は、内側面及び外側面を有する皮膚試料の未変性組織培養方法であって、内側面を細胞外支持マトリックスに隣接させ、外側面を培地表面より上に露出させることにより、培地に浸漬したマトリックス上に該皮膚試料を置き、マトリックスとその上の皮膚を皮膚培養条件下で維持することを含む方法を提供する。

細胞外支持マトリックスは、コラーゲン含有ゲル、ホモ多糖類スポンジ又は上層のコラーゲン含有ゲルと下層のホモ多糖類スポンジを含む組み合わせマトリックスであることが好ましい。コラーゲン含有ゲルはゲル化ブタ皮膚が好ましく、ホモ多糖類はセルロースが好ましい。

本発明に従って用いられる皮膚試料は、哺乳動物由来のものが好ましく、ヒト由来のものが更に好ましい。

更に、本発明は、未変性状態組織培養皮膚のための細胞外支持マトリックスで

あって、上層のコラーゲン含有ゲルと下層のホモ多糖類スポンジを含むマトリックスを提供する。

また更に、本発明は、皮膚毒性アッセイであって、(a)皮膚培養条件下で、内側面及び外側面を有する皮膚試料を、内側面を細胞外支持マトリックスに隣接させ、外側面を培地表面より上に露出させることにより、培地に浸漬した細胞外支持マトリックス上で培養し、(b)皮膚試料を推定上の毒素と接触させ、(c)毒素の存在下で皮膚試料とマトリックスを所定時間維持し、(d)皮膚試料の生存度により毒素の皮膚毒性を評価する工程を含むアッセイを提供する。

生存度は、生存又は死細胞に特異な指示薬の皮膚試料細胞への取込みを測定することにより評価する。指示薬は光学的検出が可能な染料が好ましく、蛍光染料が更に好ましい。また、生存度は生存細胞に特異な第1染料と死細胞に特異な第2染料を培地に加え、染料含有培地を所定時間維持し、場合によっては皮膚試料を光学的に走査して皮膚試料中の第1及び第2染料の分布を定量することにより評価し、これにより毒性を評価する。

好ましい実施態様においては、皮膚毒性アッセイは、更に皮膚試料を推定上の毒素と接触させる前に皮膚試料の生存度を評価し、推定上の毒素との接触前後の評価生存度により毒素の毒性を比較することを含む。

また、本発明は、毛髪成長アッセイであって、(a)毛髪の成長が可能であり内側面及び外側面を有する皮膚試料を、内側面を細胞外支持マトリックスに隣接させ、外側面を培地表面より上に露出させることにより、培地に浸漬した細胞外支持マトリックス上で培養し、(b)毛髪成長状態の第1測定を行い、(c)培地中で皮膚試料とマトリックスを所定時間維持し、(d)毛髪成長状態の第2測定を行い、(e)毛髪成長状態の第1及び第2測定を比較することにより、毛髪成長を求めることを含むアッセイを提供する。

毛髪成長状態は、毛の長さのような毛の物理的寸法であることが好ましい。

本発明の1つの利点は、皮膚の組織培養系を提供することにより、皮膚の未変性状態の三次元構造が培養中維持されることである。

本発明のもう1つの利点は、推定上の毒素の皮膚に対する作用を求める簡易で費用の掛からない信頼性のある皮膚毒性アッセイを提供することである。このよ

うなアッセイは、また推定上の毒素の影響を生体外で評価する経済上効率のよい手段となり、このアッセイは生きている動物を毒素に曝す必要がない。このアッセイは、皮膚科学的研究及び試験において細胞生存度及び生化学応答を研究するモデルとなるものである。

また、本発明のもう1つの利点は、毛髪成長を生体外で評価し、組成物の毛髪成長についての作用を測定する簡易で費用の掛からない信頼性のある手段を提供することである。

図面の簡単な説明

本開示の一部をなす図面において：

図1は、実施例1に記載されるように2日間組織培養したマウス皮膚をBCECF-AM(生細胞-緑)及びPI(死細胞-赤)で二重染色したものを見せる着色顕微鏡写真である。同焦点走査レーザー顕微鏡。倍率1000Xの立体画像。

図2は、イーグルMEMで6日間組織培養し、^{[3]H}-チミジンで3~6日間標識したマウス皮膚を示す着色顕微鏡写真である。実施例1に記載されるように皮膚を固定し、オートラジオグラフィー用に処理し、ヘマトキシリソ及エオジンで染色した。オートラジオグラムを明視野及び偏光で観察した。^{[3]H}-チミジン標識核は鮮やかな緑色に見える。倍率1000X。

図3は、実施例2に記載されるように2日間組織培養し、BCECF-AM(生細胞-緑)とPI(死細胞-赤)で二重染色し、次いで、エタノールで処理したマウス皮膚の毛髪の生存度を示す着色顕微鏡写真である。左側の画像はエタノール処理前の皮膚を示し、右側の画像は処理後の皮膚を示す。上の画像は、0.5% (v/v)エタノール処理した皮膚を示す。下の画像は、5.0% (v/v)エタノール処理した皮膚を示す。同焦点走査レーザー顕微鏡。倍率1000X。立体画像。

図4は、2日間組織培養したマウス皮膚の生存度に関するエタノールの用量依存性毒性作用の図表である。毒性は、実施例2に記載されるようにエタノール処理の5分後BCECF-AMとヨウ化プロビジウム(PI)の相対吸収として評価し、エタノール濃度の閾値として致死細胞%として示される。

図5は、4日間組織培養したマウス皮膚の生存度に関するドキソルビシンの用量依存性毒性作用の図表である。毒性は、実施例2に記載されるようにドキソル

ビシン処理の24時間後BCECF-AMとPI染色の相対吸収として評価し、ドキソルビシン濃度の閾値として致死細胞%として示される。

図6は、2日間組織培養したマウス皮膚における異種細胞の生存度に関するドキソルビシンの用量依存性毒性作用の図表である。毒性は、ドキソルビシン処理の24時間後^{[3]H}-チミジン取込みとして評価した。細胞増殖%は、ドキソルビシン処理皮膚における標識細胞%の対照非処理皮膚における標識細胞%に相対する%として算出した。

図7は、組織培養マウス皮膚の生存度及びマウス皮膚の生体内刺激に関する次亜塩素酸ナトリウムの用量依存性毒性作用を示す。毒性は、実施例2に記載されるように次亜塩素酸ナトリウム濃度の閾値として致死細胞(%)及び一次刺激指数(PII)の両方で評価される。

図8は、実施例3に記載されるように数種のマトリックスを用いた組織培養マウス皮膚系における毛髪成長を生体内皮膚における毛髪成長と比較する図表である。

発明の詳細な説明

A. 未変性状態組織培養法

本発明の1態様は、内側面及び外側面を有する皮膚試料の未変性状態組織培養法であって、内側面を細胞外支持マトリックスに隣接させ、外側面を培地表面より上に露出させることにより、培地に浸漬したマトリックス上に該皮膚試料を置き、皮膚培養条件下でマトリックスとその上の皮膚を維持することを含む方法に関する。

本アッセイにおいて、任意の動物から採取した任意の皮膚を用いることが可能である。動物は哺乳動物であることが好ましい。哺乳動物の例は、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、キヌザル、サル及びヒトである。特に好ましい動物は、ヒトである。

真皮層及び表皮層を有する皮膚試料は、典型的には動物から切り取られる。余分な脂肪がある場合には取り除かれる。皮膚試料は、皮膚が毛髪の成長を支持することができる有毛動物又は皮膚に毛髪がない無毛動物、例えば無胸腺マードアニマルから切り取られる。皮膚試料を有毛動物から得る場合、皮膚は切採前に毛

が剥られるか又は刈り込まれる。

皮膚試料は、本明細において内側面及び外側面を有するものと定義される。“内側面”とは、真皮方向面、即ち、動物において未変性状態にある皮膚の非露外面を意味する。“外側面”とは、表皮方向面、即ち、動物において未変性状態にある皮膚の露外面を意味する。

本発明で用いられる皮膚片の表面積に関して制限は全くない。典型的には、皮膚試料は外表面積約1～約10,000平方ミリメートル(mm^2)の範囲とすることが可能である。好みの表面積は、約4～約10 mm^2 である。更に好みの表面積は約1 mm^2 である。皮膚の厚さは、得られる動物によって変化する。皮膚試料がマウスから切り取られる場合、好みの厚さは約1～2 mm である。

皮膚試料は支持マトリックス上で培養される。本発明の支持マトリックスは、培地から未変性状態にある皮膚の内面(底部)に栄養水溶液を送達する毛細管現象に適した間隙を有する柱状構造を与える。即ち、この能力がある任意の支持体が予想され、ナイロン、ポロケイ酸塩ガラス繊維もしくはポリプロピレンのような合成メッシュ又はセルロースもしくはコラーゲンのような有機メッシュが挙げられる。支持マトリックスは細胞外支持マトリックスであることが好みである。本発明で用いられる“細胞外支持マトリックス”とは、ゲル又はスポンジのような固体物を意味し、1種以上の有機分子又は分子集合体を含み、その分子又は集合体は細胞によって細胞外領域に産生及び分泌されるものであり、三次元組織構成及び機能を維持する支持、接着及び骨格として生体内で作用する。そのような分子の例は、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン等の高分子量タンパク質及び糖タンパク質、複合多糖類及び類似の分子である。

好みの実施態様においては、細胞外支持マトリックスはコラーゲン含有ゲルである。コラーゲン含有ゲルの例は、ゲル化ブタ皮膚、例えばGELFOAM™(Upjohn Company, Kalamazoo, MI)及びラミニン、コラーゲン、プロテオグリカン及びエンタクチンを含む組成物、例えばMATRIGEL™(Collaborative Research Inc., Bedford, MA)である。GELFOAM™は、米国特許第2,465,357号に記載されている特許された生産物であり、この開示を本明細書に参考として引用する。

もう1つの好みの実施態様においては、細胞外支持マトリックスはホモ多糖

類スポンジである。Leighton, J. 'l Cancer Inst., 12:545-561 (1951)。好みのホモ多糖類はセルロースである。本発明で企図されるホモ多糖類スポンジは、ウェーブやネットサイズに関して制限されない。

またもう1つの好みの実施態様においては、細胞外支持マトリックスは、コラーゲン含有ゲルとホモ多糖類スポンジの組み合わせを含む。そのような組み合わせは、上層のコラーゲン含有ゲルと下層のホモ多糖類スポンジを含むことが好みである。コラーゲン含有ゲルはゲル化ブタ皮膚が好みで、ホモ多糖類スポンジはセルロースが好みである。特に好みの実施態様においては、支持マトリックスは上層のGELFOAM™と下層のセルローススポンジの組み合わせを含み、そのマトリックスは組織培養された皮膚の正常な毛髪成長を維持するのに最も有効であることを示した(実施例3参照)。

皮膚試料サイズの細胞外支持マトリックスサイズに対する比率は設定しない。マトリックスは、皮膚試料よりサイズが大きく実質的に皮膚試料と重なるように支持するのに十分な直径から任意とすることができます。皮膚試料が実際に相接しない限り、複数の試料を同一マトリックス上に置くことができる。皮膚試料間の好みの距離は約1～2 mm である。

皮膚試料は、皮膚の内側面がマトリックスと隣接し、皮膚の外側面がマトリックスから離れて面するようにマトリックス上に置かれる。好みの実施態様においては、皮膚の内側面がマトリックスと接触した状態にある。この配置において、皮膚の外側面は、本方法により皮膚についての作用を評価する毒薬又は他の組成物と接触させるのに有効である。

マトリックスとその上の皮膚試料は、マトリックスと接触するが皮膚を完全に覆わない培地量で浸漬される。即ち、皮膚の外側面は浸水されず、培地の表面より上に露出する。培地の表面はマトリックスの上面より0.5～2 mm 内側にあり、ウィッキング効果により皮膚試料と液が接触する。例えば、皮膚試料が約1～2 mm の厚さを有する場合、培地の表面は皮膚の外側面より約0.5～約2 mm 下にあることが好みである。

細胞外支持マトリックスは典型的には軟質であり、その上に皮膚試料を置く際にマトリックスの縁が皮膚試料の垂直線に接触することができるようへこませ

てもよい。

細胞外支持マトリックスを、その上に皮膚試料を置く前にマトリックスを培地で平衡化するために前処理する。マトリックスの前処理は、マトリックスを所定のサイズに切断し、カットマトリックスを無菌容器内の培地にマトリックスを培地で飽和し平衡化するのに十分な時間浸漬することを含む。好みの浸漬時間は37°Cで4時間である。

本発明で企図される培地は、皮膚試料の生存度を促進及び維持するように計画された水性栄養培地である。好みの培地は、10% (v/v)ウシ胎児血清(FBS)と抗生物質で補足されたイーグル最小必須培地(EMEM)である。抗生物質の例は、ゲンタマイシン、ストレプトマイシン、ペニシリン、カノマイシン等である。好みの抗生物質はゲンタマイシンである。培地中の抗生物質の最終濃度は、用いられる具体的な抗生物質に左右される。抗生物質がゲンタマイシンの場合、好みの濃度は培地1 mlにつき約0.2 mgである。他の培地、好みはウシ胎児血清の使用を含むか又は当該技術で周知の血清を含まない特定培地を用いたものを使用することもできる。

マトリックスとその上の皮膚試料は、無期限に培地中で維持される。培地は2～3日毎に変えることが好みである。

本発明の皮膚組織培養系の1つの利点は、簡易で費用の掛からない生体外モデルを提供することであり、それにより皮膚の未変性状態三次元構造が長時間維持される。従来の皮膚培養系では、皮膚の生存度をせいぜい1又は2日間維持しただけであった。Kao等、Toxicology and Applied Pharmacology, 81:502-516 (1985)。

本発明のもう1つの態様は、かかる系に有効な細胞外支持マトリックスである。1実施態様においては、細胞外支持マトリックスがコラーゲン含有ゲル、例えばGELFOAM™又はMATRIGEL™を含む。もう1つの実施態様においては、細胞外支持マトリックスがホモ多糖類スポンジ、例えばセルローススポンジを含む。好みの実施態様においては、細胞外支持マトリックスが上層のコラーゲン含有ゲル及び下層のホモ多糖類スポンジを含む組み合わせマトリックスである。上層のGELFOAM™と下層のセルローススポンジを含む組み合わせマトリックスが最も好み

い。かかるマトリックスは、組織培養マウス皮膚において正常な毛髪成長を支持するのに優れた性状を有する(実施例3参照)。

B. 皮膚毒性アッセイ

本発明のもう1つの態様は、皮膚毒性アッセイであって、(a)皮膚培養条件下、内側面及び外側面を有する皮膚試料を、内側面を細胞外支持マトリックスに隣接させ、外側面を培地表面より上に露出させることにより、培地に浸漬した細胞外支持マトリックス上で培養し、(b)皮膚試料を推定上の毒薬と接触させ、(c)毒薬の存在下で皮膚試料とマトリックスを所定時間維持し、(d)皮膚試料の生存度により毒薬の皮膚毒性を評価する工程を含むアッセイに関する。

毒性アッセイに用いられる皮膚試料は、毛髪のないことが好みである。無毛皮膚の好みの試料は、無胸腺ヌードアニマルのような無毛動物である。ヌードアニマルの例は、Balb/Cヌードマウス由来の非近交系ヌードマウス株である。

皮膚毒性アッセイの場合の細胞外支持マトリックス、培地及び培養条件は、未変性組織培養法について上述したものと同一である。

1実施態様においては、生存度が生存細胞に特異な指示薬の皮膚試料の細胞への取り込みを測定することにより評価される。本明細書で用いられる“生存細胞に特異な”とは、指示薬が生きて死んでいない細胞に吸収あるいは取り込まれることを意味する。

生存細胞に特異な指示薬は、生細胞に接近する代謝前駆体又は非代謝物質とすることができる。代謝前駆体の例は、リボ又はデオキシリボ核酸前駆体、例えばプリン、ビリミン、ヌクレオシド及びヌクレオチドである。検出を容易にするために、代謝前駆体を指示手段に操作的に結合することが好みである。代謝前駆体指示薬として好みの指示手段は、放射能標識、例えば³⁵S、³³P、³¹I、³H等である。特に好みの放射能標識代謝前駆体指示薬は³H-チミンである。

生存細胞に特異な好みの非代謝指示薬は、光学的検出が可能な染料である。生存細胞に特異的である当該技術において確認されている任意の染料は、本発明の皮膚毒性アッセイに從って用いることができる。例えば、Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, ed. R. P. Haugland, Molecular Probes, publisher, Eugene, Oregon (1989-1991)参照。

特表平6-505636 (5)

好みの実施態様においては、染料が蛍光染料である。生存細胞特異的蛍光染料はBCECF-AM(B-1150)、カルセイン-AM(C-1430)、CFDA(カルボキシフルオレセンジアセテート:C-195)、アクリシンオレンジ(A-1301)、カルセインブルー(H-1426)、フラ-2AM(F-1201)、フルオレセンジアセテート(F-1303)又はカルボキシ類縁体(C-1431)等である。このような染料は当該技術において周知であり、市販されている(Molecular Probes, Eugene OR)。染料BCECF-AM又はカルセイン-AMが特に好みである。括弧内の数字はMolecular Probesから入手できる蛍光染料リストの製品番号を示す。

1実施態様においては、生存細胞に特異な蛍光染料の取り込みあるいは吸収が生存細胞の代謝活性に左右される。本実施態様によれば、非蛍光染料は生存細胞によって吸収され、エステラーゼのような細胞内酵素によって蛍光産物に転換される。細胞内蛍光の存在は生存度を示す。

もう1つの実施態様においては、死細胞に特異な指示薬の皮膚試料の細胞への吸収あるいは取り込みを測定することにより、生存度が評価される。本明細書に用いられる“死細胞に特異な”とは、指示薬が非生存死細胞にのみ吸収あるいは取り込まれることを意味する。

典型的には、死細胞に特異な染料は、染料が無傷な細胞膜を通過することができないような高イオン電荷及び低透過性を有する化合物である。細胞が死ぬと、死細胞に特異な染料が核膜のような細胞内成分に結合する細胞内領域に接近するよう、膜が構造上又は機能上破壊される。

好みの死細胞特異的指示薬は、光学的検出が可能な染料である。好みの死細胞特異的染料は、ヨウ化プロビジウム、臭化エチジウム、エチジウムホモ二量体[(5, 5'-ジアザデカメチレン)ビス(3, 8-ジアミノ-6-フェニル-2-フェナントリジウム)ジクロリド、2塩酸塩]等の蛍光染料である。ヨウ化プロビジウムが最も好みである。ヨウ化プロビジウム(PI)及び死細胞に特異な他の染料は、当該技術において周知であり市販されている(Molecular Probes, Eugene, OR)。

またもう1つの好みの実施態様においては、生存細胞に特異な指示薬と死細胞に特異な指示薬の双方の吸収あるいは取り込みを同時に測定することにより生存

度の評価が行われる。生存度は生存細胞の死細胞に対する比率として評価される。生存細胞に特異な指示薬と死細胞に特異な指示薬の双方が蛍光染料である場合、かかる染料は生存細胞と死細胞の間の区別を容易にするように異なる発光スペクトルを有するべきである。生存細胞と死細胞に特異な指示薬の識別吸収による細胞生存度を定位する組成物及び方法及び組培養試料は当該技術において周知である。上記 Haughland。

好みの実施態様においては、皮膚毒性アッセイが、更に皮膚試料を推定上の毒性和接触する前に皮膚試料の生存度を評価し、推定上の毒性和接触する前後の評価生存度を比較することにより毒性的毒性和求めることを含むものである。

生存細胞に特異な指示薬の吸収あるいは取り込みを検出する手段は、用いられる具体的な指示薬に左右され、当業者に周知である。放射能標識代謝前駆体の検出に好みの手段は、前駆体を吸収した皮膚試料の組織学的切片のオートラジオグラフィーである。

染料の検出に好みの手段は顕微鏡試験である。顕微鏡試験は、三次元未変性皮膚組織培養中の種々の場所において皮膚試料の特異細胞への指示薬取り込みを退却的且つ再現性ある評価をすることができる任意の顕微鏡の使用を含むことができる。

典型的には、顕微鏡試験は光学的切片法の能力を必要とする。光学的切片法は、皮膚内のミクロソーム、気泡、脂肪球及び光の反射及び光学的妨害を与える他の組織成分の存在による光学的妨害なしに皮膚の三次元構造内の所定の厚みを見る方法である。

更に、光学的切片法は三次元皮膚組織培養内の種々の面を見ることができる。皮膚の連続層を連続的に切り取ることにより、皮膚の全様相あるいは問題の具体的な種類の細胞が位置する皮膚領域の様相を作製することができる。即ち、皮膚の多数の厚み又は領域の比較研究をすることができる。このようにして、表面細胞、真皮層底部の細胞、表皮層内部の細胞又は他の特定の種類の細胞、例えば神経細胞、油分泌細胞、毛髪細胞の生存度を評価することができる。

光学的切片の厚さは、観察されるべき細胞サイズ又は組織を調節するために変動させることができ、約0.1～100ミクロンの範囲とことができる。好

ましい切片は0.5～10ミクロンの範囲にあり、約2～6ミクロンが好みである。

光学的切片法を行うことができる好みの顕微鏡は、10× PlanApo式対物鏡を用いたNikon Optiphotに取り付けたMRC-600 CONFOCAL IMAGING SYSTEM(Bio-Rad, Richmond, Ca.)のような同焦点走査レーザー顕微鏡である。かかる同焦点走査顕微鏡を用いて皮膚毒性を研究することに成功した(実施例1及び2参照)。組織試料面の他の有効な光学的走査又は切片方法も本発明により企図される。

皮膚内の任意の特定場所の生存度は、生存細胞及び死細胞に各々特異な指示薬の吸収に基づいて生存細胞又は死細胞の全細胞に対する比率又は生細胞の死細胞に対する比率として評価される。生存度を推定上の毒性和接觸前後の両方で評価する場合、推定上の毒性和接觸前後に評価される生細胞の死細胞に対する比率を比較すると推定上の毒性的毒性和示される。

指示薬を皮膚培養に適用する方法は、用いられる具体的な指示薬により異なる。典型的には、皮膚試料を培地に置いた約6時間後に、好みは24時間後に、指示薬が培地に加えられる。指示薬を培地に加えた後、培養条件下で皮膚試料の細胞に指示薬が入り標識するのに十分な時間培養を維持する。指示薬の存在下で約5分から約2時間培養を維持することが好みで、約10～20分が更に好みである。

培地に添加する指示薬の濃度は、用いられる具体的な指示薬により異なる。蛍光染料PI及びBCECF-AMを使用する場合、染料濃度は各々約1～約100ミクログルであり、約2～50ミクログルが好みで、約5ミクログルが更に好みである。

典型的には、毒性和培地に直接加えることにより皮膚試料を推定上の毒性和接觸させる。また、毒性和皮膚試料の表面に直接加える。毒性和添加した後、皮膚試料は毒性和培地中に所定時間維持され、その時間は実験する具体的な毒性和より異なる。

本発明の皮膚毒性アッセイは、現在用いる毒性和試験法より有利で有益である。1つの主な利点は、生きている動物を毒性和物質に曝すことがない信頼性のある生体外アッセイの提供に関する。即ち、本アッセイは、Draize試験のような皮膚毒性試験の伝統的な形態を置き換えるために用いることができる。

C. 毛髪成長アッセイ

またもう1つの態様においては、本発明は毛髪成長アッセイであって、内側面と外側面を有する皮膚試料を、内側面を細胞外支持マトリックスに隣接させ、外側面を培地表面より上に露出させることにより、培地に浸漬したマトリックス上に該皮膚試料を置き、皮膚培養条件下で、マトリックスとその上の皮膚を培地中で維持し、皮膚における毛髪の成長を評価することを含むアッセイに関する。

毛髪成長アッセイの場合、皮膚試料を毛髪動物から入手するので、皮膚試料は毛細胞を含み、毛幹を囲む皮膚に典型的に見られる毛囊、毛幹等を含む毛髪成長を支持する組織成分の正常な補足を含んでいる。皮膚試料は複数の毛幹を含むことが好みである。特に好みの動物は乳児動物である。好みの実施態様においては、背、頭又は頑皮から切り取られるが毛髪成長を支持する任意の皮膚が用いられる。動物から切り取られる前に、皮膚試料は毛を剃られるか又は刈り込まれる。皮膚から毛囊を取り除かず、毛囊から毛幹の基底部を取り除かない限り、他の毛髪の除去方法を用いることができる。

細胞外支持マトリックスの種類、培地の組成及び培養条件は、組織培養系及び皮膚毒性アッセイに関して上記で定義したものと實質的に同一である。

毛髪成長アッセイは、(a) 有毛動物から得られ内側面と外側面を有する皮膚試料を、内側面を細胞外支持マトリックスに隣接させ、外側面を培地表面より上に露出させることにより、培地に浸漬した細胞外支持マトリックス上で培養し、(b) 毛髪成長状態の第1測定を行い、(c) 培地中の皮膚試料とマトリックスを所定時間維持し、(d) 毛髪成長状態の第2測定を行い、(e) 毛髪成長状態の第1及び第2測定を比較することにより、毛髪の成長を求める工程を含む。

本明細書で用いられる“毛髪成長状態”とは、毛髪成長を表す任意のパラメーターを意味する。かかるパラメーターは毛の物理的寸法であることが好みで、毛の長さ又は直径であることが更に好みである。毛髪成長状態を測定する手段は、実験される具体的なパラメーターに左右される。パラメーターが毛の長さである場合、長さは組織培養皮膚試料のその場で求められる。パラメーターが毛の直径である場合、毛幹の顕微鏡拡大を用いるその場で又は組織学的に切り取った毛幹の顕微鏡写真を用いる生体外で直径が求められる。毛髪成長を評価するアッセイは、当該技術で周知である。Frailey等,J. Invest. Dermatol., 61:72-81(1973)。

成長を測定する生体外手段を提供する他に、セイは推定上の毛髪成長剤の作用を評価するのに有用である。本実施態様においては、毛髪成長状態の第1測定が組織培養皮膚試料で行われ、推定上の毛髪成長剤を皮膚試料と接触させ、皮膚試料を刺激剤の存在下で所定時間維持し、毛髪成長状態の第2測定を行い、かかる薬剤のあり又はなしでの毛髪成長の変化を比較する。この実施態様は、例えばミノキシジル、ジアゾキシド等の薬剤の多毛作用を試験するのに極めて有用である。

また、毛髪成長アッセイは、成長以外の毛髪の特徴を研究するために変更することができる。例えば、毛の色を変えるように計画された染料のような組成物の効能及び安全性を試験するためにこのアッセイを用いることができる。本アッセイ及びその変法は、毛髪成長又は性状に影響するように計画された化合物の製造業者にヒトのような生きている動物で試験する前に生体外でその化合物を試験する機会を与える。

D. 抗老化／抗しわアッセイ

本発明の未変性状態皮膚組織培養系は、推定上の抗老化又は抗しわ剤の抗老化又は抗しわ作用を評価するアッセイに適用することもできる。このアッセイの場合、細胞外支持マトリックス、培地及び皮膚培養条件は、皮膚毒性アッセイについて上述したものと実質的に同一である。しかしながら、抗老化又は抗しわアッセイに用いられる皮膚試料は、有毛又は無毛動物から得られる。

抗老化アッセイにおいては、皮膚老化を表すパラメーターを評価する。老化を表すパラメーターの例としては、表皮の厚さ（表皮は老化で薄くなる）、表皮のメラニン含量（メラニン含量は老化で減少する）及び皮膚数（數は老化で減少する）が挙げられる。Cecil Textbook of Medicine, 15th Edition ed. Beeson等, W. B. Saunders, Philadelphia, pp. 27 及び 2272 (1979)。

抗しわアッセイにおいては、しわを表すパラメーターを評価する。しわを表すパラメーターの例としては、コラーゲン及びエラスチン含量（双方がしわの増加と共に減少する）、皮膚の弾力性及び表皮のひだの頻度及び分布のような物理的パラメーターが挙げられる。上記Textbook of Medicine。

抗老化又は抗しわアッセイの1実施態様においては、しわ又は老化の微候を示

す老化動物ドナーから皮膚を得、老化又はしわ過程を逆転又は弱める能力について推定上の抗老化又は抗しわ剤を試験する。

もう1つの実施態様においては、動物の子供から皮膚試料を得、老化又はしわを防止する能力について推定上の抗老化又は抗しわ剤を試験する。

本発明の抗老化又は抗しわアッセイは、多くの用途や応用がある。このアッセイは、保湿剤、粗体、軟化剤、乳化剤等の化粧品の作用を試験するために用いられる。

1実施態様においては、皮膚試料の多くのパラメーターを試験物質による処理前後に評価することができる。このようにして、老化、しわ、毒性及び毛髪成長について種々の物質の作用に関するデータを同一の組織培養系で同時に評価することができる。

下記実施例は本発明の特定の実施態様を具体的に説明するものであり、特にことわらない限り明細書及び請求の範囲を限定するものではない。

実施例

1. 未変性状態皮膚組織培養

外表面積約10mm²及び厚さ約1～2mmを有する皮膚試料を無胸腺ヌードマウスから切り取り、約0.2mg/mlのゲンタマイシン及び10% (v/v) 胎児ウシ血清を含むイーグルMEMに浸漬した GELFOAMTMマトリックス上に置いた。使用する前に、マトリックスを培地に37℃で4時間浸漬してマトリックスを培地中で平衡化した。

9.5% 空気及び5% CO₂の混合物でガス処理したインキュベーター内約37℃の温度で培地中のマトリックス上で皮膚試料を維持した。図1及び2に示されるように培養開始後種々の時間で培養した皮膚試料の生存度を評価した。生存細胞に特異な指示薬BCECF-AMと死細胞に特異な指示薬（ヨウ化プロビジュム、PI）の吸収又は [³H]-チミジンの吸収として生存度を評価した。

蛍光染料指示薬BCECF-AM及びPI (Molecular Probes, Eugene, OR) を最終濃度5ミクロモルで培地に直接添加した。培地に染料を添加した30分後10×PlanApo対物鏡を備えたNikon Optiphottに取り付けた MRC-600 CONFOCAL IMAGING SYSTEM (Bio-Rad, Richmond, CA) を用いた光学走査により、染料の取り込みを顕微鏡的に評

価した。試料を約4ミクロンの光学的切片を用いて観察した。

[³H]-チミジンを最終濃度4μCi/mlで培地に直接添加した。皮膚試料をチミジン含有培地で3日間維持した。3日後、皮膚培養液をリン酸塩緩衝食塩水、pH 7.0で洗浄し、組織学カプセルに入れ、10% (v/v) ホルマリンで固定した。次いで、組織学者に周知の標準方法により、固定皮膚培養液を脱水し、パラフィンに包埋し、切片にし、スライドに置いた。スライドを脱パラフィン化し、コダックNTB-2 エマルジョンで被覆し、5日間露光し、現像した。例えば、Freeman等, Proc. Soc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:2694-2698 (1986) 及び Hoffman等, Proc. Soc. Acad. Sci. USA, 86:2013-2017 (1989)。

現像したスライドを洗浄し、ヘマトキシリソ及エオジンで染色し、エビリューション顕微鏡を用いたり試験した。これらの実験の結果を図1及び2に示す。

図1に示されるように、イーグル最小必須培地中の浮遊 GELFOAMTMマトリックス上で2日間組織培養したマウス皮膚は、主要な種類全ての細胞の未変性三次元組織構築の保存を示した。毛髪、表皮細胞及び真皮線維芽細胞が、BCECF-AM (緑一生細胞) を取込んでいるがPI (赤死細胞) を取込んでいない同焦点顕微鏡により容易に可視化され、正常な形態を有すると思われる。皮膚組織培養は、少なくとも10日間生存可能であった。

図2に示されるように、皮膚組織培養液中の細胞は、6日間まで増殖活性を保持した。写真用偏光顕微鏡を用いた組織学的オートラジオグラフィーにより示されたDNA合成及び複製 ([³H]-チミジン標識核は鮮やかな緑色である) は、毛髪、表皮細胞及び真皮細胞で明らかであった。毛髪、表皮細胞及び真皮細胞の [³H]-標識細胞%は、各々38.6%、75.2%及び10.2%であった。

これらのデータは、イーグルMEM中の GELFOAMTMマトリックス上で組織培養した場合、皮膚試料が少なくとも数日間生存を維持することを示している。

2. 皮膚毒性アッセイ

無胸腺ヌードマウスから得た皮膚試料を実施例1の方法に従って培養した。生存細胞に特異な指示薬としてBCECF-AM及び [³H]-チミジン及び死細胞に特異な指示薬としてPIを用いて推定上の毒性的添加前後に生存度を評価した。これらの

指示薬の吸収は、実施例1の方法に従って求めた。

BCECF-AM及びPIを用いた組織培養開始2日後に最初の生存度を評価した。この最初の評価直後に、種々の濃度の毒性和エタノール、ドキソルビシン又は次亜塩素酸ナトリウムを皮膚試料と接触させた。毒性的最終濃度は、エタノールの場合約0.5～約70% (v/v) 、ドキソルビシンの場合約2.9～7.25mgs/ml及び次亜塩素酸ナトリウムの場合約0.6～約60.0% (v/v) に変動させた。

皮膚試料をエタノール、ドキソルビシン又は次亜塩素酸ナトリウムと各々約5分、約2.4時間及び約2時間接触させた。これらの接触時間の後、毒素含有培地を新しい非毒素含有培地と交換し、皮膚試料をBCECF-AM及びPIを用いた生存度について再評価した。毒素との接触前後に皮膚試料の同一領域の生存度を評価した。

更に、ドキソルビシンと接触させた皮膚試料を毒素接触の2.4時間後に測定される [³H]-チミジンの吸収を用いて生存度について評価した。

これらの実験の結果を図3～7に纏める。

図3は、エタノール処理前後の組織培養マウス皮膚の君色顕微鏡写真である。エタノールの毒性和エタノール処理前の生存度を評価し、2つの生存度評価を比較することにより求めた。上記実施例1の生存度の評価に従い、生存細胞は緑に染色され、死細胞は赤に染色される。顕微鏡写真は、エタノール処理前（左側の画像）にはマウス皮膚の大多数の細胞が生存していたことを示している。0.5% (v/v) (上右側の画像) あるいは5.0% エタノール（下右側の画像）で処理した後、多数の細胞が死んでいる。更に、データは、5.0% エタノールが0.5% エタノールより毒性（生存度の減りが大きい）であったことを示している。3.0%、5.0% 及び7.0% エタノールを用いた結果は、5%を用いて見られた減りの程度より生存度の減りが増加することを示した（データは示されていない）。

図4のデータは、組織培養マウス皮膚についてエタノールの用量依存性毒性作用を示す。本実験においては、毒性を致死細胞の%として示した。処理培養液の全細胞 [PI-陽性（赤）及びBCECF-AM-陰性（緑）細胞] に関して致死細胞 (PI-陽性細胞) のフラクションを同焦点蛍光走査顕微鏡で測定し、未処理の対照と比較して細胞毒性を求めた。致死細胞の%は、処理後の赤色細胞数 - 処理前の赤色細胞数を全細胞数 (処理後の緑色細胞数 + 処理後の赤色細胞数) で割ったもの

として示される。データは、致死細胞%（毒性）とエタノールの濃度が増加するにつれて増加することを示している。

皮膚毒性に関するドキソルビシン又は次亜塩素酸ナトリウムの作用を、上記エタノールの場合と同様の方法で求めた。

図5のデータは、組織培養マウス皮膚に関するドキソルビシンの用量依存性毒性作用を示す。データは、ドキソルビシンの毒性が組織培養系に添加したドキソルビシン濃度に相対的に比例したことを示している。

図6のデータは、未変性組織培養マウス皮膚内の種々の細胞、即ち、真皮細胞、表皮細胞及び毛囊細胞についてドキソルビシンの用量依存性毒性作用を示している。組織培養マウス皮膚をドキソルビシンで24時間処理すると用量依存方式で皮膚細胞のDNA合成を阻害した。本実験においては、毒性を細胞増殖%として表した。細胞増殖%は、(1)ドキソルビシン処理試料中全細胞に対する [³H]-チミジンで標識した細胞の%を(2)対照の未処理皮膚試料中全細胞に対する [³H]-チミジン標識細胞の%と比較した比率として算出した。対照と相対的にドキソルビシン処理は、用量依存性の細胞増殖低下を生じた。データは、ドキソルビシンの作用が具体的な細胞の種類で異なることを示している。ドキソルビシンの毒性は毛囊細胞で最も顕著であった。

図7は、生体内で行われる皮膚毒性評価と比較した場合、本発明の生体外組織培養皮膚試料を用いた皮膚毒性評価の信頼度を評価するために行われた比較実験を示す。毒性の生体内評価は、以下で示される皮膚刺激標準試験を用いて求めた。

異なった濃度の次亜塩素酸ナトリウムに浸漬した小さなガゼペーパー片(サイズ約1.5 cm²)をマウスの背面の3ヶ所にしっかりととかぶせた。次亜塩素酸ナトリウムを除去して1/2時間及び1時間後に紅斑及び浮腫の皮膚部位を1~4段階で評点した。各濃度の次亜塩素酸ナトリウムに対する一次刺激指数(PII)を次式から誘導した。

$$PII = \frac{\text{全評点(紅斑及び浮腫)}}{\text{部位数} \times \text{観察数}}$$

本実験の結果を図7に纏める。

図7のデータは、生体内で評価した毒性と組織培養マウス皮膚で評価した毒性

との間に高い正相関を示している。特に、データは毒性の閾値(次亜塩素酸ナトリウム約0.6%)が2系で一致したことを示している。

これらのデータは、本発明の皮膚毒性アッセイが推定上の毒素の作用を信赖でき且つ正確に評価するために用いることができる事を示している。

3. 毛髪成長アッセイ

有毛マウスから得た皮膚試料を細胞外支持マトリックスの3種類の処方を用いて実施例1の方法に従って組織培養した。細胞外支持マトリックスの3処方は、GELFOAM™マトリックス、上層のMATRIGEL™と下層のセルローススポンジを含む組み合わせマトリックス及び上層のGELFOAM™と下層のセルローススポンジを含む組み合わせマトリックスとした。

毛髪成長は、組織培養の6日間の毛の長さの変化として評価した。比較のために、毛髪成長を同一期間生体外で測定した。本実験の結果を図8に纏める。

図8のデータは、組織培養したマウス皮膚が毛髪成長の正常な速度を支持したことを見ている。皮膚試料を上層のGELFOAM™下層のセルローススポンジを含む組み合わせマトリックスで組織培養した場合、組織培養皮膚試料の毛髪成長は生体内成長速度に極めて近似した。

これらのデータは、実施例1及び2で得たデータと共に、本発明の方法に従って組織培養した皮膚試料が(1)正常な未変性状態の三次元構造を維持し、(2)数日間生存を維持し、(3)細胞増殖を示し、(4)正常な毛髪成長を支持することを見ている。更に、これらのデータは、かかる組織培養法が皮膚毒性及び毛髪成長のための信頼できる生体外アッセイを提供することを見ている。

ここでは本発明を特定の好みの実施態様によって述べ、それに關して例示してきたが、その思想を逸脱することなく種々の修正、変更、省略及び置換がなされてもよいことを当業者は容易に理解するであろう。

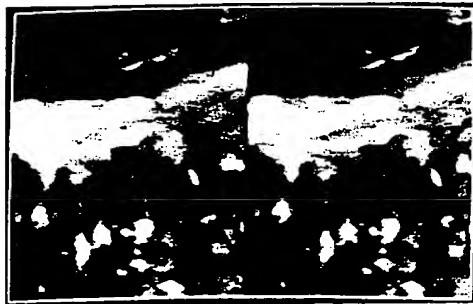


FIG. 1



FIG. 2



FIG. 3

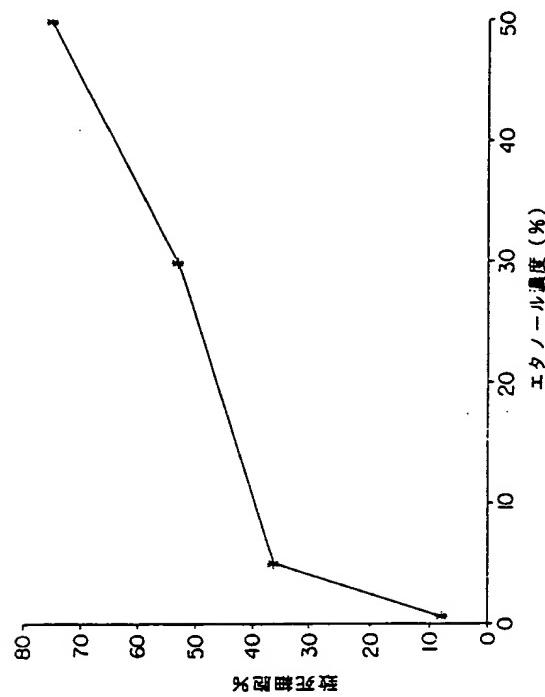


FIG. 4

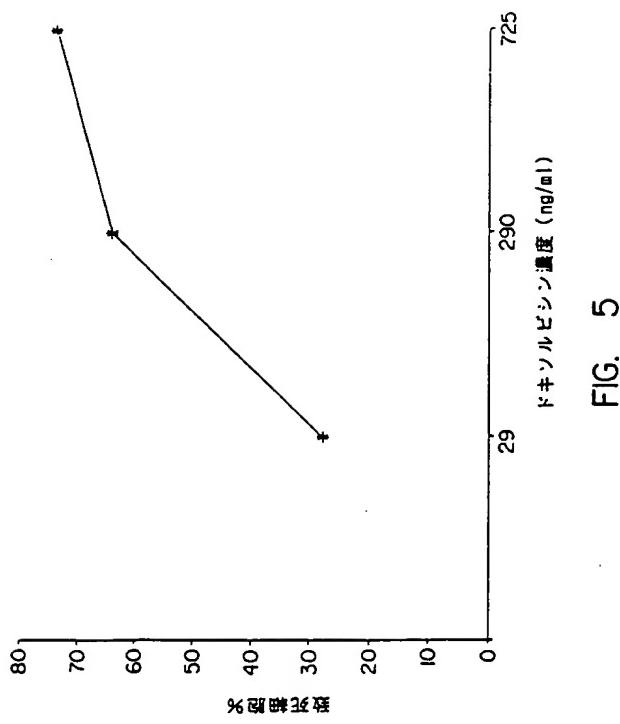


FIG. 5

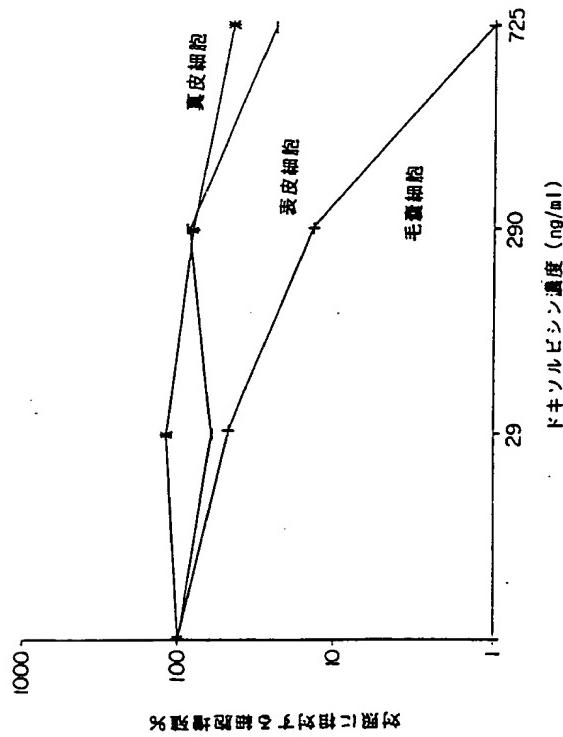


FIG. 6

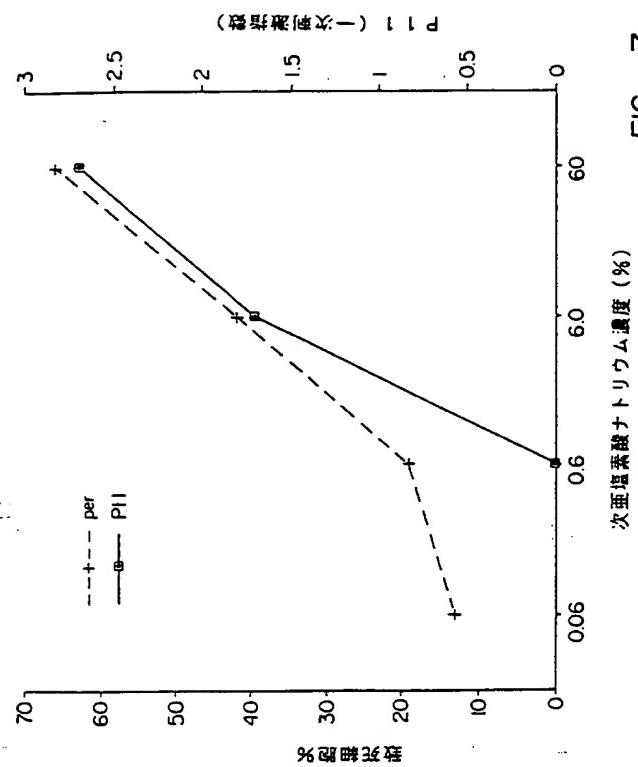
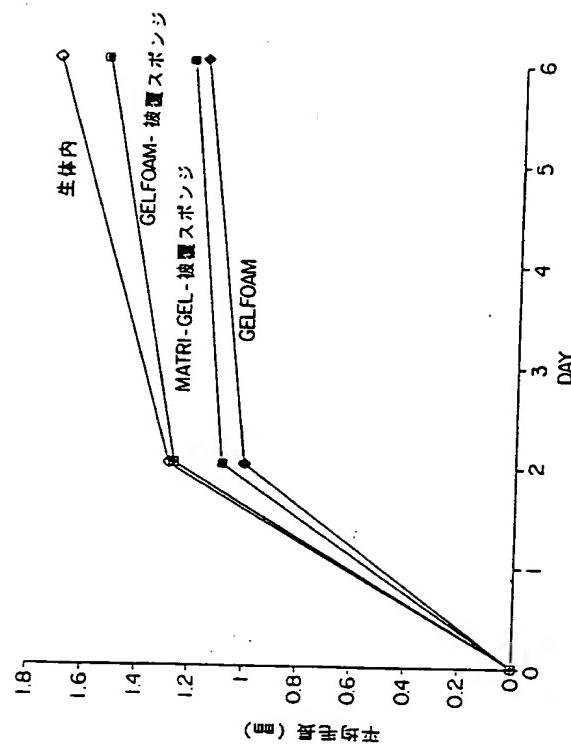


FIG 7



8

国際調査報告

International Application No. PCT/US82/01871

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all)¹

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC
 IPC (S) : C12Q 1/00
 US CL : 435/240.243, 4

II. FIELDS SEARCHED

Classification System	Minimum Documentation Searched ²	
	Classification Symbols	
U.S.	435/240.243. 4. 240.1. 1	

Documentation Searched other than Minimum Documentation
 to the extent that such Documents are included in the Fields Searched³

APS, CAS, MEDLINE, BIOSIS

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT⁴

Category ⁵	Character of Document, ⁶ with indication, where appropriate, of the relevant passage(s) ⁷	Relevant to Claim No. ⁸
Y	US.A.4,940,853(VANDEBURGH) 10 JULY 1990. SEE ENTIRE DOCUMENT.	1-26
Y, P	US.A.5.015,584(BRYSK) 14 MAY 1991. SEE ENTIRE DOCUMENT.	1-28
Y	US.A.4,919,664(OLIVER ET AL) 24 APRIL 1985. SEE ENTIRE DOCUMENT.	29-40
Y	US.A.4,963,489(NAUGHTON ET AL) 16 OCTOBER 1990. SEE ENTIRE DOCUMENT.	1-40
Y	SURGICAL VOLUME 103, NUMBER 4, ISSUED 1988, BOYCE ET AL, "BIOLOGICAL ATTACHMENT, GROWTH AND DIFFERENTIATION OF CULTURED HUMAN EPIDERMAL KERATINOCYTES ON A GRAFTABLE COLLAGEN AND CHONDROITIN-6-SULFATE SUBSTRATE." PAGES 421-443. SEE ENTIRE DOCUMENT.	1-40

¹ Several categories of cited documents:

² A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.

³ Other documents, but published on or after the priority date, which may throw doubt on priority claimed or which is cited to establish the publication date of another document referred to as prior art.

⁴ Other documents, but published on or before the priority date, which may throw doubt on the priority claimed or other reasons.

⁵ Prior art document cited prior to the international filing date but later than the priority date claimed.

⁶ Later documents published after the international filing date, but prior to the priority date, which are cited with the application but which are irrelevant to the present invention.

⁷ The theory underlying the invention; the claimed invention cannot be considered to involve the same step or series of steps as those recited in the document.

⁸ The document from which the information is derived; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents.

⁹ Document resulting at the time of filing.

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search¹⁰

Date of Filing of the International Search Report¹¹

05 MAY 1992

19 MAY 1992

International Searching Authority¹²

Signatures of Authorized Officer¹³

ISA/US

L. BLAINE LANFORD

Form PCT/ISA/110 (revised edition UNMv1.1984.6)